CE

FLEX
Monoclonal Rabbit
Anti-Human
Estrogen Receptor α
Clone EP1
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

English
Code IS084

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human Estrogen Receptor α, Clone EP1, Ready-to-Use (Dako Autostainer/ Autostainer Plus), is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments to semi-quantitatively detect human estrogen receptor in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections of human breast cancer. The antibody labels estrogen receptor α-positive cells and is useful in the assessment of estrogen receptor status in human breast carcinomas

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Synonyms for antigen

ER α

Summary and explanation

Steroid receptors exhibit a high affinity and specificity for their ligands. The human estrogen receptor (ER) is a dimeric protein of 65 kDa located primarily on the membrane of cell nuclei and belongs to a class of trans-acting proteins which stimulate transcription by binding to specific DNA elements, also known as hormone response elements. Through binding estrogen, the ER is induced to stimulate gene transcription, hence is also known as an inducible enhancer factor (1, 2).

Historical studies have shown that ER status is positively correlated with untreated outcome (ie. prognostic for well differentiated invasive breast cancer) and with response to anti-hormonal therapy e.g., tamoxifen. (2) Estrogens have been found to be preferentially concentrated in the estrogen target organs of animals and in human breast cancers and it is well documented that the mitogenic effects of estrogen are mediated by ER. Investigations into the biological mechanisms for breast cancer growth have found that the growth rate is dependent on the presence of estrogen or progesterone or both in most breast cancers (2). Thus, estrogen receptor status in breast carcinomas is considered to be a validated prognostic and predictive factor for patient management for anti-hormonal therapy (2-4).

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Ready-to-use monoclonal rabbit antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.

Clone: EP1.

Immunogen

Recombinant protein of ER α amino acids 1-300.

Specificity

In Western blotting of MCF7 cells lysates the antibody labels a major band of approximately 67 kDa, corresponding to the expected molecular weight of ER α. No cross-reactivity was seen with ER β.

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 ℃. Do not use after expiration date s tamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation including materials required but not supplied

The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004) for 20 minutes at 97 °C followed by 5 minutes in EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code K8007).

Paraffin-embedded sections: Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004). After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

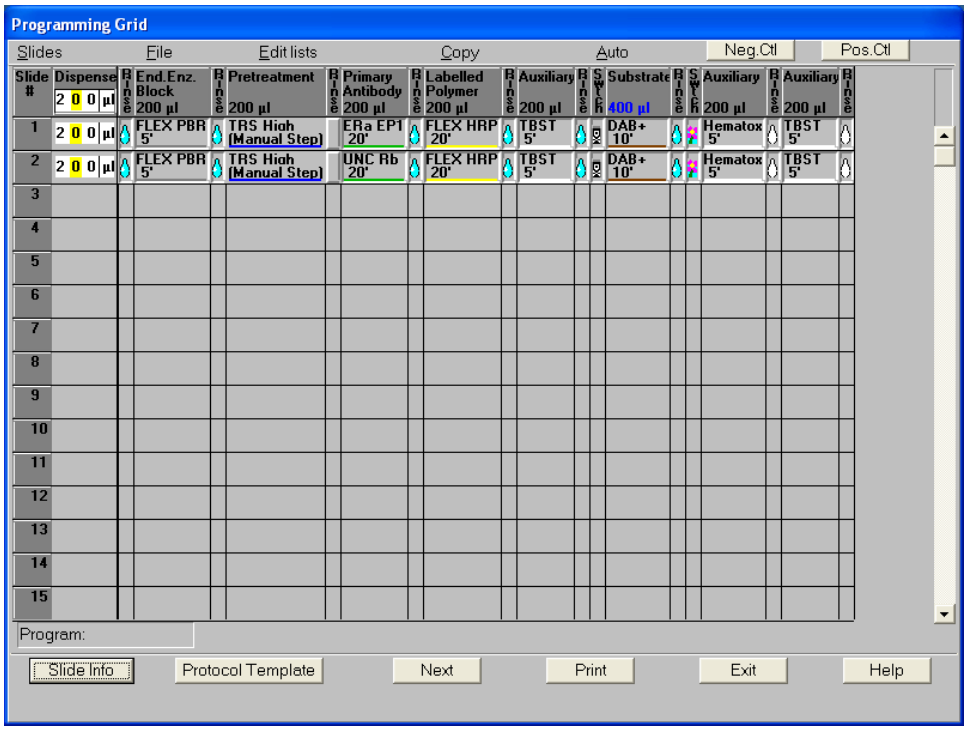
The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Dako Silanized Slides (Code S3003) is recommended.

Staining procedure including materials required but not supplied

The recommended visualization system is EnVision™ FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010) used according to the protocol given below. Reagents must be appropriately diluted before use. All steps should be performed at room temperature (20-25 °C).

1. Incubate tissue section with 200 µL EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DM821) for 5 (±1) minutes.
2. Rinse in EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code K8007) for 1-5 minutes.
3. Incubate tissue section with 200 µL primary antibody (Code IS084) for 20 (±1) minutes .
4. Rinse in EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code K8007) for 1-5 minutes.
5. Incubate tissue section with 200 µL EnVision™ FLEX/HRP (Code DM822) for 20 (±1) minutes.
6. Rinse in EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code K8007) for 1-5 minutes.
7. Incubate tissue section with 200 µL EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code K8007) for 5 (±1) minutes .
8. Rinse in EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code K8007) for 1-5 minutes.
9. Incubate tissue section with 400 µL EnVision™ FLEX Substrate Working Solution (Codes DM823 and DM827) for 10 (±1) minutes.
10. Rinse in EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code K8007) for 1-5 minutes.
11. Counterstain slide with EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code K8018) for 5 (±1) minutes.
12. Rinse in deionized water for 1-5 minutes.
13. Incubate tissue section with 200 µL EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code K8007) for 5 (±1) minutes.
14. Rinse in deionized water for 1-5 minutes.
15. Mount slides with permanent mounting medium.

Programming grid for recommended assay:



All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator's Manual for the dedicated instrument. The Auxiliary step should be set to "rinse buffer" in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to "none". This ascertains comparable wash times.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be validated by each individual laboratory (5). Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the

staining pattern is identical to the staining pattern described in “Performance characteristics”.

Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8018). Non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

It is recommended that positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. Ideally the positive controls should include a low ER-expressing breast carcinoma tissue. As an alternative, benign cervix may also be used. The cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in “performance characteristics” in all positive specimens.

The recommended negative control reagent is FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS600).

Staining interpretation

The cellular staining pattern is nuclear. Cytoplasmic labeling, if observed, should be regarded as non-specific.

A positive result is defined as nuclear staining in ≥1% of tumor cells (6.). This is consistent with ASCO/CAP’s recommended cut-off of ≥1% positive tumor cells for positive assessment (3).

Product specific limitation

1. False-negative results could be caused by degradation of the antigen in the tissues over time. Specimens should be stained within 2 months of mounting of tissues on slides when stored at room temperature (7).
2. For optimal and reproducible results, the ER protein requires target retrieval when tissues are routinely fixed (neutral buffered formalin) and paraffin embedded.
3. Use of Dako Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Clone EP1 on tissues with fixatives other than formalin has not been validated.

Performance characteristics

Precision: Serial sections from each of three different formalin-fixed paraffin-embedded blocks of breast carcinoma were collected for testing. Testing was performed as follows:

Intra-run Precision: Following the standard EnVision™ FLEX, High pH protocol, three sections from each tissue block were stained with Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Clone EP1. Concurrently one section from each block was stained with a negative control reagent.

Inter-run Precision: Staining one section from each tissue block, the above procedure was repeated on two additional days. Concurrently, one section from each tissue block was stained with a negative control reagent.

Inter-instrument Precision: Staining three sections from each tissue block, the above procedure was performed on three different Autostainer instruments. Concurrently, one slide from each tissue block was stained with a negative control reagent.

Precision experiments with Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Clone EP1 yielded consistent results with intra-run, inter-run and inter-instrument testing. Consistent test conditions were maintained throughout the study and reagents were stored at 2-8 ºC between test runs.

Normal tissues: Table 1 contains a summary of Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Clone EP1 immunoreactivity on the recommended panel of normal of normal tissues. All tissues were formalin-fixed and paraffin-embedded and stained with Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Clone EP1 according to the instructions in the package insert.

Table 1: Summary of Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Clone EP1 Normal Tissue Reactivity (8)

Tissue Type (# tested)	Positively Staining Tissue Elements
Adrenal (3)	0/3
Bone marrow (3)	0/3
Breast (2)	2/2 Glandular epithelial cells (20%), nuclear
Cerebellum (3)	0/3
Cerebrum (3	0/3
Cervix (3)	3/3 Epithelial cells (30%), nuclear
	3/3 Stromal cells (30%), nuclear
Colon (3)	0/3
Esophagus (3)	1/3 Epithelial cells (<1%), nuclear
Kidney (3)	0/3
Liver (3)	0/3
Lung (3)	0/3
Mesothelial cells (3)	0/3
Muscle, cardiac (3)	0/3
Muscle, skeletal (3)	0/3
Nerve, peripheral (3)	0/3
Ovary (3)	3/3 Follicular epithelium (20-40%), nuclear
	2/3 Stromal cells (10-30%), nuclear
Pancreas (3)	0/3
Parathyroid (3)	0/3
Pituitary (3)	0/3
Prostate (3)	3/3 Stromal cells (<5-30%), nuclear
Salivary gland (3)	0/3
Skin (3)	0/3
Small intestine (3)	0/3
Spleen (3)	0/3
Stomach (3)	0/3
Testis (3)	0/3

Thymus (3)	0/3
Thyroid (3)	0/3
Tonsil (3)	2/3 Epithelial cells (≤1%), nuclear
	1/3 Germinal center lymphocytes (<1%), nuclear
Uterus (3)	3/3 Myometrium(<1-40%) nuclear
	3/3 Glandular epithelium (50-80%), nuclear
	3/3 Stromal cells (30-80%), nuclear

Method comparison: Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Clone EP1 testing was performed with EnVision™ FLEX and scored according to ASCO/CAP guidelines (≥1% cut-off) (3). Anti-ER α cocktail (Clones 1D5 and ER-2-123) testing was performed using Dako ER/PR pharmDx™ Kit and scored using the Allred scoring guideline described in the package insert. The method comparison data are presented in Table 2. Using these respective scoring guidelines, Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Clone EP1 was highly concordant with the ER α antibody component of Dako ER/PR pharmDx™ Kit staining, exhibiting values for overall, positive and negative agreement of 96.2%, 98.9% and 92.2%, respectively.

Table 2: Agreement between Anti-ER α, Clone EP1 and Anti-ER α Component of ER/PR pharmDx™ Kit

		Anti-ER α Component of ER/PR pharmDx™ Kit		
		Positive	**Negative**	Total
Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Clone EP1	**Positive**	183	10	193
	Negative	2	119	121
	Total	185	129	314

Positive Percent Agreement = 183/185 = 98.9%
Negative Percent Agreement = 119/129 = 92.2%
Overall Percent Agreement = 302/314 = 96.2%
Kappa= 0.9203
95% Confidence Interval= 0.8761 – 0.9645

Français
Réf. IS084

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Le FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human Estrogen Receptor α, clone EP1, prêt à l'emploi (Dako Autostainer/Autostainer Plus), est destiné à être utilisé en immunohistochimie en combinaison avec les instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus en vue de la détection semi-quantitative du récepteur des œstrogènes dans des coupes tissulaires de cancer du sein incluses en paraffine et fixées au formol. L'anticorps marque les cellules α-positives du récepteur des œstrogènes et est utile dans l'évaluation du statut du récepteur des œstrogènes dans les carcinomes mammaires humains.

L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Synonymes de l'antigène

ER α

Résumé et explication

Les récepteurs stéroïdiens présentent une affinité et une spécificité élevées envers leurs ligands. Le récepteur des œstrogènes humains (ER) est une protéine dimère de 65 kDa située principalement sur la membrane des noyaux cellulaires et appartient à une classe de protéines trans-activatrices qui stimulent la transcription en se liant à des éléments ADN spécifiques, également connus comme éléments de réponse hormonale. Via la liaison aux œstrogènes, l'ER est induit pour stimuler la transcription génique, raison pour laquelle on parle également d'activateur de transcription inductible (1, 2).

Des études précédentes ont montré que le statut ER est positivement corrélé au résultat sans traitement (c.-à-d. le pronostic pour les cancers invasifs du sein bien différenciés) et avec la réponse au traitement antihormonal, p.ex., le tamoxifène (2). On a découvert que les œstrogènes sont concentrés de préférence dans les organes cibles de l'œstrogène des animaux et dans les cancers du sein de la femme, et que l'ER sert de médiateur aux effets mitogéniques des œstrogènes. Des recherches sur les mécanismes biologiques de la croissance du cancer du sein ont mis en évidence que le taux de croissance dépend de la présence d'œstrogènes ou de progestérone ou des deux dans la plupart des cancers du sein (2). Par conséquent, on considère que le statut du récepteur des œstrogènes dans les carcinomes mammaires est un pronostic valide et un facteur prédictif de la prise en charge des patientes pour la thérapie antihormonale (2, 4).

Se reporter aux « *Instructions générales de coloration immunohistochimique* » de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis

Anticorps monoclonal de lapin prêt à l'emploi, fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : EP1.

Immunogène

Protéine recombinante des acides aminés du ER α 1 à 300.

Spécificité

Par Western Blot de lysats de cellules MCF7, l'anticorps marque une bande principale d'environ 67 kDa correspondant au poids moléculaire attendu du ER α. Aucune réactivité croisée au ER β n'a été observée.

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), un produit chimique hautement toxique sous sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patients. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et si un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes tissulaires incluses en paraffine et fixées au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Le prétraitement avec un démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire à l'aide du Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se reporter au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de l'EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004) pendant 20 minutes à 97 °C , suivies de 5 minutes dans de l'EnVision™ FLEX Wash Buffer (Réf. K8007).

Coupes incluses en paraffine : le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure 3 en 1 de préparation de l'échantillon pour Dako PT Link. Suivre la procédure de prétraitement indiquée dans la notice de l'EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004). Après la coloration, les sections doivent être déshydratées, éclaircies et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

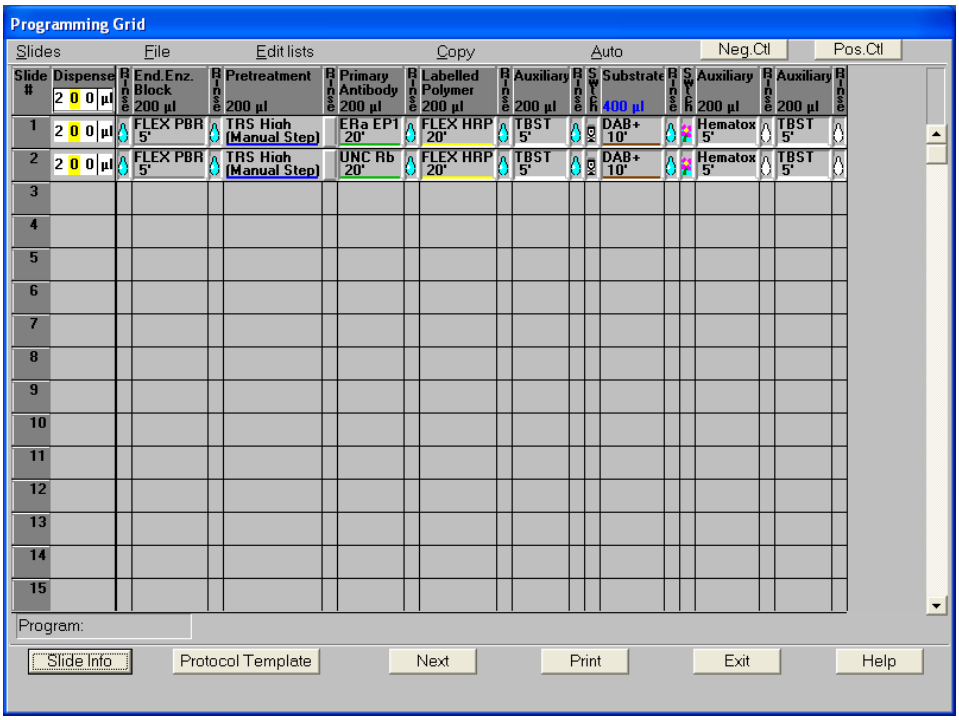
Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique qui suit. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames Dako Silanized Slides (Réf. S3003).

Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni

Le système de visualisation recommandé est le suivant : EnVision™ FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010), utilisé conformément au protocole proposé ci-après. Les réactifs doivent être dilués de manière appropriée avant utilisation. Toutes les étapes doivent être réalisées à température ambiante (20-25 °C).

1. Incuber les coupes de tissu avec 200 µL d'EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Réf. DM821) pendant 5 (± 1) minutes.
2. Rincer dans de l'EnVision™ FLEX Wash Buffer (Réf. K8007) pendant 1-5 minutes.
3. Incuber les coupes de tissu avec 200 µL de primary antibody (Réf. IS084) pendant 20 (± 1) minutes.
4. Rincer dans de l'EnVision™ FLEX Wash Buffer (Réf. K8007) pendant 1-5 minutes.
5. Incuber les coupes de tissu avec 200 µL d'EnVision™ FLEX/HRP (Réf. DM822) pendant 20 (± 1) minutes.
6. Rincer dans de l'EnVision™ FLEX Wash Buffer (Réf. K8007) pendant 1-5 minutes.
7. Incuber les coupes de tissu avec 200 µL d'EnVision™ FLEX Wash Buffer (Réf. K8007) pendant 5 (± 1) minutes.
8. Rincer dans de l'EnVision™ FLEX Wash Buffer (Réf. K8007) pendant 1-5 minutes.
9. Incuber les coupes de tissu avec 400 µL d'EnVision™ FLEX Substrate Working Solution (Réf. DM823 et DM827) pendant 10 (± 1) minutes.
10. Rincer dans de l'EnVision™ FLEX Wash Buffer (Réf. K8007) pendant 1-5 minutes.
11. Procéder à une contre-coloration des lames avec de l'EnVision™ FLEX Hematoxylin (Réf. K8018) pendant 5 (± 1) minutes.
12. Rincer dans de l'eau déionisée pendant 1-5 minutes.
13. Incuber les coupes de tissu avec 200 µL d'EnVision™ FLEX Wash Buffer (Réf. K8007) pendant 5 (± 1) minutes.
14. Rincer dans de l'eau déionisée pendant 1-5 minutes.
15. Monter les lames avec un milieu de montage permanent.

Grille de programmation du dosage recommandé :



Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. L'étape Auxiliary doit être réglée sur « rinse buffer » lors des cycles de coloration comportant 10 lames ou moins. Pour les cycles de coloration comportant plus de 10 lames, l'étape Auxiliary doit être réglée sur « none ». Cela confirme des temps de lavage comparables.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être validées par chaque laboratoire de manière individuelle (5). Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en s'assurant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration dans de l'hématoxyline à l'aide d'EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). L'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Il est recommandé de procéder à des contrôles positifs et négatifs en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Idéalement, les contrôles positifs doivent inclure des tissus de carcinome mammaire à faible expression d'ER. Des tumeurs bénignes du col de l'utérus pourraient être utilisées comme alternative. Les cellules/structures doivent présenter les schémas de réaction décrits pour ces tissus dans les « Caractéristiques de performance » pour tous les échantillons positifs.

Le réactif de contrôle négatif recommandé est le FLEX Universal Negative Control, Rabbit, prêt à l'emploi (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. IS600).

Interprétation de la coloration

Le profil de coloration cellulaire est nucléaire. Le marquage cytoplasmique, s'il est observé, doit être considéré comme non spécifique.

Un résultat positif est défini comme une coloration nucléaire dans ≥1 % des cellules tumorales (6). Ce dernier est cohérent avec la valeur seuil ≥1 % de cellules tumorales positives recommandée par le groupe ASCO/CAP pour l'évaluation positive (3).

Limites spécifiques au produit

1. Des faux négatifs peuvent être dus à une dégradation de l'antigène dans les tissus au fil du temps. Les échantillons doivent être colorés dans les 2 mois suivant le montage des tissus sur les lames lorsqu'ils sont conservés à température ambiante (7).
2. Pour des résultats optimaux et reproductibles, la protéine ER requiert une restauration des cibles lorsque les tissus sont fixés en routine (formol neutre tamponné) et inclus en paraffine.
3. L'utilisation de l'anticorps Dako Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, clone EP1 sur des tissus fixés par d'autres produits que le formol n'a pas été validée.

Caractéristiques de performance

Précision : des coupes en série ont été prélevées pour évaluation sur chacun des trois blocs de carcinome mammaire différents fixés au formol et inclus en paraffine. L'analyse a été réalisée comme suit :

Précision intra-cycle : conformément au protocole standard EnVision™ FLEX, High pH, trois coupes de chaque bloc tissulaire ont été colorées au Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, clone EP1. Simultanément, une coupe provenant de chaque bloc a été colorée à l'aide d'un réactif de contrôle négatif.

Précision inter-cycles : en colorant une coupe provenant de chaque bloc tissulaire, la procédure a été répétée sur deux jours supplémentaires. Simultanément, une coupe provenant de chaque bloc tissulaire a été colorée à l'aide d'un réactif de contrôle négatif.

Précision inter-instruments : en colorant trois coupes provenant de chaque bloc tissulaire, la procédure ci-dessus a été réalisée sur trois instruments Autostainer différents. Simultanément, une lame provenant de chaque bloc de tissu a été colorée à l'aide d'un réactif de contrôle négatif.

Les expériences de précision avec le Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, clone EP1 ont donné des résultats cohérents avec les analyses intra-cycle, inter-cycles et inter-instruments. Les mêmes conditions d'analyse ont été conservées tout au long de l'étude et les réactifs ont été stockés entre 2 et 8 ºC entre les cycles de test.

Tissus sains : le tableau 1 contient un résumé de l'immunoréactivité au Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, clone EP1 avec le panel recommandé de tissus sains. Tous les tissus ont été fixés au formol et inclus en paraffine puis colorés au Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, clone EP1, conformément aux instructions de la notice.

Tableau 1 : Résumé de la réactivité au Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, clone EP1 dans les tissus sains (8)

Type de tissus (nombre testé)	Éléments tissulaires colorés positivement
Amygdale (3)	2/3 : cellules épithéliales (≤ 1 %), noyau 1/3 : lymphocytes du centre germinatif (< 1 %), noyau
Cellules mésothéliales (3)	0/3
Cerveau (3)	0/3
Cervelet (3)	0/3
Col de l'utérus (3)	3/3 : cellules épithéliales (30 %), noyau 3/3 : cellules stromales (30 %), noyau
Côlon (3)	0/3
Estomac (3)	0/3
Foie (3)	0/3
Glande salivaire (3)	0/3
Hypophyse (3)	0/3
Intestin grêle (3)	0/3
Moelle osseuse (3)	0/3
Muscle, cardiaque (3)	0/3
Muscle, squelettique (3)	0/3
Nerf périphérique (3)	0/3
Œsophage (3)	1/3 : cellules épithéliales (< 1 %), noyau
Ovaire (3)	3/3 : épithélium folliculaire (20-40 %), noyau 2/3 : cellules stromales (10-30 %), noyau
Pancréas (3)	0/3
Parathyroïde (3)	0/3
Peau (3)	0/3
Poumon (3)	0/3
Prostate (3)	3/3 : cellules stromales (< 5-30 %), noyau
Rate (3)	0/3
Rein (3)	0/3
Sein (2)	2/2 : cellules épithéliales glandulaires (20 %), noyau
Surrénale (3)	0/3
Testicule (3)	0/3
Thymus (3)	0/3
Thyroïde (3)	0/3
Utérus (3)	3/3 : myomètre (< 1-40 %), noyau 3/3 : épithélium glandulaire (50-80 %), noyau 3/3 : cellules stromales (30-80 %), noyau

Comparaison des méthodes : les tests au Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, clone EP1 ont été réalisés avec l'EnVision™ FLEX et notés conformément aux directives du groupe ASCO/CAP (valeur seuil ≥1 %) (3). Les tests du cocktail anti-ER α (clones 1D5 et ER-2-123) ont été réalisés à l'aide du Dako ER/PR pharmDx™ Kit et notés en suivant les directives de notation Allred décrites dans la notice. Les données sur la comparaison des méthodes sont présentées dans le tableau 2. À l'aide de ces directives de notation respectives, le Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, clone EP1 a été hautement concordant avec la coloration à l'anticorps ER α du Dako ER/PR pharmDx™ Kit, présentant des valeurs pour une concordance totale, positive et négative de 96,2 %, 98,9 % et 92,2 %, respectivement.

Tableau 2 : Concordance entre l'anti-ER α, clone EP1 et le composant anti-ER α du ER/PR pharmDx™ Kit

		Composant anti-ER α du ER/PR pharmDx™ Kit		
		Positifs	**Négatifs**	Total
Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Clone EP1	**Positifs**	183	10	193
	Négatifs	2	119	121
	Total	185	129	314

Concordance positive en pourcentage = 183/185 = 98,9 %
Concordance négative en pourcentage = 119/129 = 92,2 %
Concordance totale en pourcentage = 302/314 = 96,2 %
Kappa = 0,9203
Intervalle de confiance à 95 % = 0,8761 – 0,9645

Deutsch
Code IS084

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human Estrogen Receptor α, Klon EP1, gebrauchsfertig (Dako Autostainer/Autostainer Plus), ist zur Verwendung mit den Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten in der Immunhistochemie bestimmt, um den humanen Östrogenrezeptor in formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten humaner Mammakarzinome semiquantitativ nachzuweisen. Der Antikörper markiert Östrogenrezeptor-α-positive Zellen und dient der Beurteilung des Östrogenrezeptor-Status bei humanen Mammakarzinomen.

Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Untersuchungen mit geeigneten Kontrollen ergänzt und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer diagnostischer Tests des Patienten vorgenommen werden.

Synonyme für das Antigen

ER α

Zusammenfassung und Erklärung

Steroidrezeptoren weisen eine hohe Affinität und Spezifität für ihre Liganden auf. Der humane Östrogenrezeptor (ER) ist ein dimeres Protein von 65 kDa, das überwiegend auf der Membran von Zellkernen vorkommt. Er gehört zu einer Klasse *trans*-agierender Proteine, die durch Bindung an spezifische DNA-Elemente, auch bekannt als hormonempfindliche Bereiche, die Transkription stimulieren. Da die Östrogenbindung den Östrogenrezeptor zur Stimulation der Gentranskription veranlasst, wird dieser auch als induzierbarer Enhancer-Faktor bezeichnet (1, 2).

Historische Studien haben gezeigt, dass der ER-Status positiv mit dem Verlauf der Erkrankung ohne Behandlung (d. h. der Prognose für gut differenzierten invasiven Brustkrebs) und mit der Reaktion auf antihormonelle Therapie, z. B. mit Tamoxifen, korreliert (2). Östrogene wurden in hoher Konzentration vor allem in tierischen Zielorganen für Östrogene und in menschlichen Brustkrebsgeweben nachgewiesen, und es ist hinreichend dokumentiert, dass die mitogene Wirkung von Östrogen durch ER vermittelt wird. Die Untersuchung der für das Brustkrebswachstum verantwortlichen biologischen Mechanismen hat gezeigt, dass die Wachstumsrate der meisten Brustkrebsarten vom Vorhandensein von Östrogen oder Progesteron oder beidem abhängig ist (2). Daher gilt der Östrogenrezeptor-Status bei Mammakarzinomen als validierter prognostischer und prädiktiver Faktor für das Patientenmanagement bei antihormoneller Therapie (2-4).

Folgende Angaben sind den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren zu entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Gebrauchsfertiger, monoklonaler Kaninchen-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L Natriumazid enthält.

Klon: EP1.

Immunogen

Rekombinantes Protein aus ER-α-Aminosäuren 1-300.

Spezifität

Beim Western-Blot von MCF7-Zelllysaten markiert der Antikörper eine starke Bande von ungefähr 67 kDa, was mit dem erwarteten Molekulargewicht von ER α übereinstimmt. Es wurde keine Kreuzreaktivität mit ER β beobachtet.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Für Fachpersonal.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid

kann auch in als ungefährlich eingestuften Konzentrationen mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.

3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend den einschlägigen gesetzlichen Regelungen von Bund, Ländern und Gemeinden zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Vorbereitung der Probe und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Es ist eine Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER-Verfahren) mit dem Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) erforderlich. Weitere Informationen finden Sie im PT Link-Benutzerhandbuch. Optimale Ergebnisse werden durch 20-minütige Vorbehandlung der Gewebe bei 97 °C mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004), gefolgt von 5 Minuten in EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code-Nr. K8007) erzielt.

Paraffineingebettete Schnitte: Die Vorbehandlung der formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte mit dem 3-in-1-Probenvorbereitungsverfahren für Dako PT Link wird empfohlen. Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) durchführen. Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit permanentem Einbettmedium auf den Objektträger aufgebracht werden.

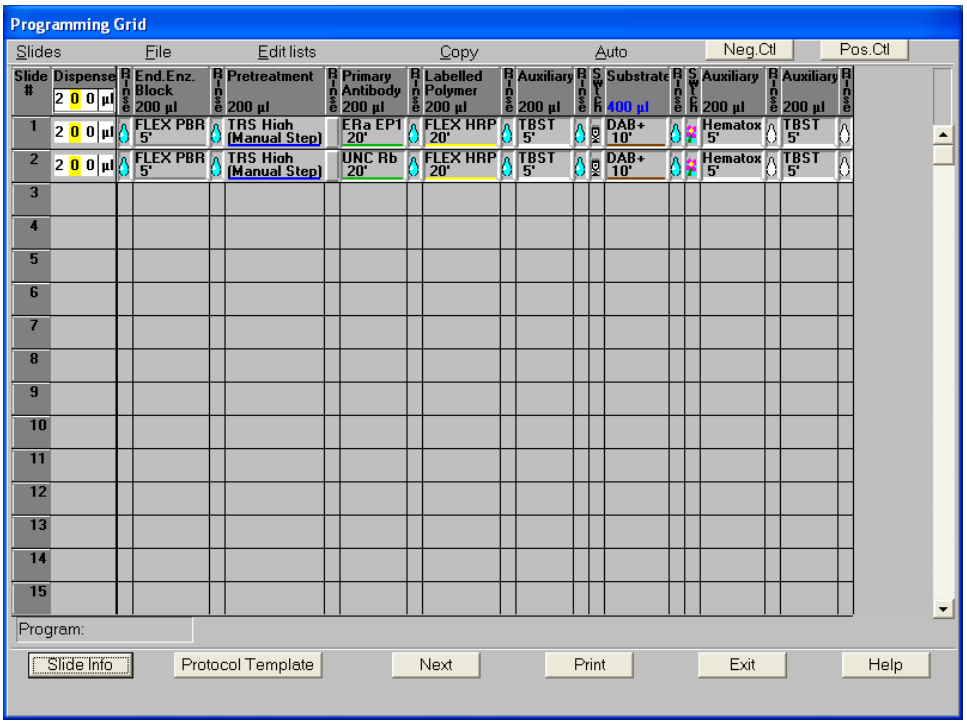
Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von Dako Silanized Slides (Code-Nr. S3003) empfohlen.

Färbeverfahren und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Als Visualisierungssystem wird EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010) empfohlen. Zu verwenden gemäß dem unten aufgeführten Protokoll. Die Reagenzien müssen vor der Verwendung entsprechend verdünnt werden. Alle Schritte sollten bei Zimmertemperatur (20–25 °C) durchgeführt werden.

1. Gewebeschnitt mit 200 µL EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Code-Nr. DM821) 5 (±1) Minuten inkubieren.
2. Mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code-Nr. K8007) 1–5 Minuten abspülen.
3. Gewebeschnitt mit 200 µL primary antibody (Code-Nr. IS084) 20 (±1) Minuten inkubieren.
4. Mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code-Nr. K8007) 1–5 Minuten abspülen.
5. Gewebeschnitt mit 200 µL EnVision™ FLEX/HRP (Code-Nr. DM822) 20 (±1) Minuten inkubieren.
6. Mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code-Nr. K8007) 1–5 Minuten abspülen.
7. Gewebeschnitt mit 200 µL EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code-Nr. K8007) 5 (±1) Minuten inkubieren.
8. Mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code-Nr. K8007) 1–5 Minuten abspülen.
9. Gewebeschnitt mit 400 µL EnVision™ FLEX Substrate Working Solution (Code-Nr. DM823 und DM827) 10 (±1) Minuten inkubieren.
10. Mit EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code-Nr. K8007) 1–5 Minuten abspülen.
11. Objektträger mit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code-Nr. K8018) 5 (±1) Minuten gegenfärben.
12. Mit entionisiertem Wasser 1–5 Minuten abspülen.
13. Gewebeschnitt mit 200 µL EnVision™ FLEX Wash Buffer (Code-Nr. K8007) 5 (±1) Minuten inkubieren.
14. Mit entionisiertem Wasser 1–5 Minuten abspülen.
15. Objektträger mit permanentem Fixiermittel fixieren.

Programmierraster für empfohlenes Assay:



Alle Inkubationsschritte sollten bei Zimmertemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten sind dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät zu entnehmen. Bei Färbedurchläufen mit ≤ 10 Objektträgern sollte der Zusatz-Schritt auf „Pufferspülgang“ eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern den Zusatz-Schritt auf „Keine“ einstellen. Dies sorgt für vergleichbare Waschzeiten.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Vorbereitungsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst validiert werden (5). Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem überprüft wird, ob das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Empfohlen wird ein nichtwässriges, permanentes Fixiermittel.

Es wird empfohlen, Positiv- und Negativkontrollen zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben zu testen. Idealerweise sollten die positiven Kontrollen ein schwach ER-exprimierendes Mammakarzinomgewebe enthalten. Alternativ kann benignes Zervixgewebe verwendet werden. Die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen.

Als Negativkontrolle wird die gebrauchsfertige FLEX Universal Negative Control, Rabbit, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. IS600) empfohlen.

Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster ist nukleär. Zytoplasmische Markierung ist, sofern sie auftritt, als unspezifisch einzustufen.

Als positives Ergebnis wird eine nukleäre Färbung von ≥1 % der Tumorzellen bezeichnet (6). Dies entspricht den Empfehlungen der American Society of Clinical Oncology (ASCO) und des College of American Pathologists (CAP), die einen Cut-off von ≥1 % bei positiven Tumorzellen für die positive Beurteilung angeben (3).

Produktspezifische Beschränkungen

1. Falsch-negative Ergebnisse können die Folge eines mit der Zeit stattfindenden Antigenabbaus in den Geweben sein. Werden Proben bei Raumtemperatur aufbewahrt, so sollten diese innerhalb von 2 Monaten nach dem Aufbringen der Schnitte auf Objektträger gefärbt werden (7).
2. Zum Erzielen optimaler und reproduzierbarer Ergebnisse für ER-Protein ist dieses einer Demaskierung zu unterziehen, wenn die Gewebe routinemäßig (in neutralem gepufferten Formalin) fixiert und in Paraffin eingebettet werden.
3. Die Verwendung von Dako Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Klon EP1 mit Geweben, die mit anderen Mittels als Formalin fixiert worden sind, wurde nicht validiert.

Leistungsmerkmale

Präzision: Für den Test wurden serielle Schnitte von jedem von drei verschiedenen formalinfixierten, paraffineingebetteten Mammakarzinom-Gewebeblöcken entnommen. Die Tests wurden wie folgt durchgeführt:

Präzision innerhalb eines Durchlaufs: Gemäß dem EnVision™ FLEX, High pH-Standardprotokoll wurden von jedem Gewebeblock drei Schnitte mit Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Klon EP1 gefärbt. Gleichzeitig wurde ein Schnitt von jedem Block mit einer Negativkontrolle eingefärbt.

Präzision bei verschiedenen Durchläufen: Das oben beschriebene Verfahren wurde an zwei weiteren Tagen wiederholt, wobei wieder je ein Schnitt von jedem Gewebeblock eingefärbt wurde. Gleichzeitig wurde ein Schnitt von jedem Gewebeblock mit einer Negativkontrolle eingefärbt.

Präzision bei verschiedenen Geräten: Das oben beschriebene Verfahren wurde mit drei verschiedenen Autostainer-Geräten durchgeführt, wobei jeweils drei Schnitte von jedem Gewebeblock eingefärbt wurden. Gleichzeitig wurde ein Objektträger von jedem Gewebeblock mit einer Negativkontrolle eingefärbt.

Präzisionsexperimente mit Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Klon EP1 ergaben sowohl bei Tests innerhalb eines Durchlaufs als auch in verschiedenen Durchläufen und mit verschiedenen Geräten übereinstimmende Ergebnisse. Während der gesamten Studie wurden gleich bleibende Versuchsbedingungen beibehalten; die Reagenzien wurden zwischen den Durchläufen bei 2–8 ℃ aufbewahrt.

Gesunde Gewebe: Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Immunreaktivität von Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Klon EP1 mit den empfohlenen gesunden Geweben. Alle Gewebe wurden formalinfixiert, paraffineingebettet und mit Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Klon EP1 gemäß den Anweisungen der Packungsbeilage eingefärbt.

Tabelle 1: Übersicht über die Reaktivität von Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Klon EP1 in gesundem Gewebe (8)

Gewebetyp (Anz. getestet)	Gewebeelemente mit positiver Färbung
Brust (2)	2 von 2 Drüsenepithelzellen (20 %), nukleär
Dünndarm (3)	0/3
Eierstock (3)	3 von 3 Follikelepithel (20–40 %), nukleär 2 von 3 Stromazellen (10–30 %), nukleär
Haut (3)	0/3
Herzmuskel (3)	0/3
Hoden (3)	0/3
Hypophyse (3)	0/3
Knochenmark (3)	0/3
Kolon (3)	0/3
Leber (3)	0/3
Lunge (3)	0/3
Magen (3)	0/3
Mandel (3)	2 von 3 Epithelzellen (≤1 %), nukleär 1 von 3 Keimzentrum-Lymphozyten (<1 %), nukleär
Mesothelzellen (3)	0/3
Milz (3)	0/3
Nebenniere	0/3
Nebenschilddrüse (3)	0/3
Nerv, peripher (3)	0/3
Niere (3)	0/3
Pankreas (3)	0/3
Prostata (3)	3 von 3 Stromazellen (<5–30 %), nukleär
Schilddrüse (3)	0/3
Skelettmuskulatur (3)	0/3
Speicheldrüsen (3)	0/3
Speiseröhre (3)	1 von 3 Epithelzellen (<1 %), nukleär
Thymus (3)	0/3
Uterus (3)	3 von 3 Myometrium (<1–40 %), nukleär 3 von 3 Drüsenepithel (50–80 %), nukleär 3 von 3 Stromazellen (30–80 %), nukleär
Zerebellum (3)	0/3
Zerebrum (3)	0/3
Zervix (3)	3 von 3 Epithelzellen (30 %), nukleär 3 von 3 Stromazellen (30 %), nukleär

Vergleich der Methoden: Tests mit Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Klon EP1 wurden unter Verwendung von EnVision™ FLEX durchgeführt und gemäß den ASCO/CAP-Richtlinien (≥1 % Cut-off) ausgewertet (3). Tests mit dem Anti-ER-α-Cocktail (Klone 1D5 und ER-2-123) wurden unter Verwendung des Dako ER/PR pharmDx™ Kit durchgeführt und gemäß den in der Packungsbeilage beschriebenen Allred-Richtlinien ausgewertet. Die Daten des Methodenvergleichs sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Anwendung der jeweiligen Auswertungsrichtlinien ergab eine hohe Übereinstimmung von Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Klon EP1 mit der ER-α-Antikörperkomponente der Dako ER/PR pharmDx™ Kit-Färbung. Die Ergebnisse für die Gesamtübereinstimmung sowie die positive und negative Übereinstimmung lagen bei 96,2 %, 98,9 % und 92,2 %.

Tabelle 2: Übereinstimmung zwischen Anti-ER α, Klon EP1 und der Anti-ER-α-Komponenten des ER/PR pharmDx™ Kit

		Anti-ER-α-Komponente des ER/PR pharmDx™ Kit		
		Positiv	**Negativ**	Gesamt
Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Clone EP1	**Positiv**	183	10	193
	Negativ	2	119	121
	Gesamt	185	129	314

Prozent positive Übereinstimmung = 183/185 = 98,9 %
Prozent negative Übereinstimmung = 119/129 = 92,2 %
Prozent Gesamtübereinstimmung = 302/314 = 96,2 %
Kappa = 0,9203
95 % Konfidenzintervall = 0,8761 – 0,9645

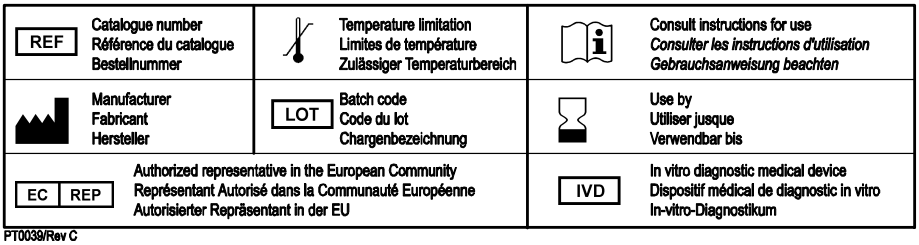
References/ Bibliographie/ Literaturhinweise

1. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin J-R, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. Cell 1987;51:941-51.
2. Elledge RM, Fuqua SAW. Ch. 31: Estrogen and Progesterone Receptors. Diseases of the Breast. Harris et al. eds., Lippincott Williams & Wilkins 2000; 471-85.
3. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred C, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. Arch Pathol Lab Med 2010;134:907–22.
4. Fitzgibbons FK, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med 2000;124:966-78.
5. Fitzgibbons PL, Murphy DA, Hammond EH, Allred C, Valenstein PN. Recommendations for Validating Estrogen and Progesterone Receptor Immunohistochemistry Assays. Arch Pathol Lab Med 2010:134;930-35.
6. Diaz LK, Sneige N. Estrogen receptor analysis for breast cancer: current issues and keys to increasing testing accuracy. Adv Anat Pathol 2005;12:10-9. Review.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Quality assurance for immunocytochemistry; Approved guideline. CLSI document MM4-A (1-56238-396-5)- CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400. Wayne, PA 19087-1898 USA 1999.
8. M3634 IHC003-D03803 Report on file.

ENGLISH:
Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Clone EP1 has been created by Epitomics Inc., using Epitomics' proprietary rabbit monoclonal antibody technology covered under Patent Nos. 5,675,063 and 7,402,409.

FRANÇAIS :
Le Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, clone EP1, a été créé par Epitomics Inc., en utilisant la technologie exclusive d'anticorps monoclonal de lapin d'Epitomics couverte par les numéros de brevet suivants : 5,675,063 et 7,402,409.

DEUTSCH:
Monoclonal Rabbit Anti-Human ER α, Klon EP1, wurde von Epitomics Inc. unter Verwendung proprietärer Technologie mit monoklonalen Kaninchen-Antikörpern entwickelt und ist durch die Patente Nr. 5,675,063 und 7,402,409 geschützt.



Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA
Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763

EC REP
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark
Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595
www.dako.com

Edition 06/11